第 36 卷 第 3 期
1993 年 8 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 36, No. 3
Aug., 1993

马尾松毛虫蛋白质、核酸酶和羧酸酯酶与耐药性的关系*

李 周 直
(南京林业大学，南京 210037)

摘要 马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Walker) 幼虫蛋白质含量、羧酸酯酶和多酚氧化酶活力与虫龄大小成正相关;氰戊菊酯处理后,兴奋期的蛋白质含量和羧酸酯酶活力上升，到抑制期均降低到正常虫体的水平,而多酚氧化酶的变动不大。正常虫体中脱氧核糖核酸酶 (DNase) 和核糖核酸酶 (RNase) 的活力存在差异: DNase 从 3—5 龄幼虫随虫体增大而上升,到 6 龄时明显降低; RNase 与虫龄大小成负相关;氰戊菊酯处理后，DNase 便开始下降并低于正常虫体的水平,而 RNase 在兴奋期上升,到抑制期下降亦低于正常虫体水平。结果说明,除多酚氧化酶外,蛋白质、核酸酶和羧酸酯酶均与耐药性存在一定的相关性,研制酶的抑制剂具有实用意义。根据毒力测定结果,马尾松毛虫幼虫随虫龄增大而耐药力增加，氰戊菊酯对 5 龄幼虫是 3 龄的 2.8 倍,6 龄是 4 龄的 2.3 倍。因此,掌握在 4 龄前进行药物防治是合理的。

关键词 马尾松毛虫 耐药性 蛋白质 核酸酶 羧酸酯酶 多酚氧化酶

马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Walker) 是我国南方森林中的主要害虫，通过长时期的大量研究和实践,对其种群动态、预测预报及防治措施等均有很大的进展。但对马尾松毛虫体内的生理生化指标及其毒剂处理后的动态变化研究得很少。何沛等(1966)曾研究过低浓度 DDT 对越冬松毛虫幼虫的毒效及处理后虫体水分、脂肪、还原糖、肝糖、维生素C及碘值等生理指标的变动；文定元等(1986)研究过四种松毛虫的酯酶同工酶；朱鹏飞等(1990)研究过马尾松毛虫血糖和血脂的变化动态及杀虫剂的影响效应。至于马尾松毛虫体内的脱氧核糖核酸酶 (DNase)、核糖核酸酶 (RNase)、羧酸酯酶。多酚氧化酶的研究更为少见。

本文研究马尾松毛虫整体组织中的蛋白质含量,核酸酶、羧酸酯酶及多酚氧化酶活力的变化动态，比较幼虫在不同龄期体内的差异，以及毒剂处理后的影响，目的在于探索幼虫期某些生理代谢指标与其耐药性的关系,为合理用药阐明理论基础。

材 料 与 方 法

一、供试虫种

供试马尾松毛虫系采自长期未使用过化学农药的江苏茅山林区，经室内用新鲜的马尾松针叶饲养数日后,选取各龄虫体活动正常的个体进行测定。

二、供试毒剂及处理方法

氰戊菊酯 95.6%(日本进口)，敌敌畏 90%(南通农药厂)。将原药用丙酮稀释成梯度

本文于 1991 年 12 月收到。
* 国家自然科学基金资助项目。

浓度，用 1μl 的毛细管点滴器点滴于幼虫胸部背板上。每个浓度处理 20 头幼虫，重复 3 次，另用丙酮处理作为对照。处理过的幼虫仍放常温下饲养，经 24 小时和 48 小时记载麻痹及死亡虫数，以 48 小时死亡率求得 LD_{50}（采用最小自乘法计算）。再用大于 LD_{50} 值点滴供试幼虫后，测定虫体内生理生化指标的变化，同时测定正常虫体(未经药剂处理)的生理生化指标。

三、酶液制备

用供试松毛虫整体置于预冷的玻璃匀浆器中，按 5ml/g 体重加入 0.02mol/L 磷酸缓冲液（pH6.0)，在冰浴中匀浆，并在 6000rpm 下冷冻离心 20 分钟，倾出上清液作为待测液，保存于冰箱内。

四、测定方法

1. 蛋白质测定　按 Bradford（1976）描述的考马斯亮兰 G-250 染色法测定。

2. DNase 活力测定　酶活力用稍加改进的 Hanson 和 Fairley（1969）方法测定。反应混合物含 0.05 ml 30 mmol/L 巯基乙醇、0.35 ml 0.05 mol/L 醋酸缓冲液（pH 5)、1ml 浓度为 1mg/ml DNA 及 0.1ml 酶液，混合后置于 37℃水浴中作用 10 分钟，然后加入 1.5 ml 冷却的硝酸镧-HCl 试剂终止反应，用 751 型分光光度计在 260 nm 下测定 O. D. 值。

3. RNase 活力测定　反应混合物中除 1ml 浓度为 1 mg/ml 酵母 RNA 代替 DNA 外，其余步骤与 DNase 测定方法相同。

4. 羧酸酯酶活力测定　用 0.04 mol/L 的磷酸缓冲液（pH 7.0）将 3×10^{-2}mol/L 的醋酸甲萘酯丙酮母液稀释 100 倍配成底物溶液，取底物溶液 5ml，与 3μl 2×10^{-4}mol/L 毒扁豆碱丙酮液混合，在 25℃水浴中平衡 5 分钟，再加入 1ml 稀释酶液，立刻摇匀计时，置 25℃水浴中 30 分钟，立刻加入 1ml 显色液（1%固兰盐溶液和 5%十二烷基硫酸钠溶液，用前以 2:5 比例混合即成)，摇匀，再经 30 分钟，待试液变成稳定的兰色后，用 751 型分光光度计，在 600nm 下测定 O. D. 值。

5. 多酚氧化酶活力测定　用 2.8ml 的 0.01mol/L 磷苯二酚（pH5.5）加 0.2ml 酶液在 37℃水浴中作用 5 分钟后，置于冰浴中终止反应，用 751 型分光光度计在 420nm 下测定 O. D. 值。

结 果 与 讨 论

一、正常马尾松毛虫 3—6 龄幼虫耐药性和几种生理生化指标的测定

昆虫的生命活动和行为受内部各系统的相互联系和协调机制所控制。蛋白质是生物体最重要的特征，它存在于所有生活的细胞中，如酶在细胞代谢过程中控制着很多化学反应。因此，蛋白质及核酸酶、羧酸酯酶、多酚氧化酶等都是昆虫能量代谢中的重要因子，它们之间一定存在着某些协调关系。本试验测定正常情况下，马尾松毛虫各龄幼虫对药剂的耐药力以及蛋白质的含量、核酸酶、羧酸酯酶、多酚氧化酶的活力。测定结果见表 1。

从表 1 的结果可以看出，马尾松毛虫幼虫随着虫龄的增大而耐药力增强。以 3 龄幼虫的相对毒力 LD_{50} 值作为 1 进行比较，氰戊菊酯对 4 龄为 1.97 倍，5 龄为 2.81 倍，6 龄为 4.51 倍；敌敌畏对 4 龄为 1.18 倍，5 龄为 1.68 倍，6 龄为 2.76 倍。从体内蛋白质含量及

表1 马尾松毛虫幼虫的耐药力及几项生理生化指标的活力*

虫龄	LD_{50} ($\mu g/g$)		蛋白质 (mg/g.鲜重)	DNase 活力	RNase 活力	羧酸酯酶 活力	多酚氧化酶 活力
	氰戊菊酯	敌敌畏					
3	0.0943	2.0310	21.60	55	85	43	25
4	0.1854	2.6019	22.74	66	75	50	41
5	0.2648	3.4220	26.88	91	68	70	50
6	0.4260	5.6130	31.42	33	44	81	69

* 1分钟内 O.D. 值增加0.01为1个酶活力单位,并以单位/克鲜重表示。

表2 马尾松毛虫各龄幼虫的耐药力及几项生理生化指标变化的相关分析

项目	回归方程	相关系数 (r)	显著性检验 (P)	相关程度
氰戊菊酯	$Y = -0.2409 + 0.1075X$	0.9859	<0.05	密切
敌敌畏	$Y = -1.7878 + 1.1567X$	0.9502	<0.05	密切
蛋白质	$Y = 10.54 + 3.36X$	0.9725	<0.05	密切
DNase	$Y = 79.7 - 4.10X$	−0.2195	>0.05	不密切
RNase	$Y = 126.5 - 13.0X$	−0.9615	<0.05	密切
羧酸酯酶	$Y = 0.70 + 13.4X$	0.9847	<0.05	密切
多酚氧化酶	$Y = -17.2 + 14.1X$	0.9917	<0.01	极密切

羧酸酯酶、多酚氧化酶的活力看，随着虫龄增大亦逐渐提高，与幼虫的耐药力成正相关，RNase 与幼虫的耐药性成负相关，其相关关系均密切(见表2)。而 DNase 的活力变化为，3—5龄幼虫随着虫龄增大 DNase 活力水平提高；当生长到老龄6龄时，DNase 活力水平明显降低，低于3龄幼虫的活力水平。这是因为 DNase 是参与核酸代谢的重要酶类之一，它与 DNA 合成和生长速度成正相关 (Eley 和 Roth, 1966)，所以当幼虫从幼龄到中龄时，DNA 合成和生长速度相平行，但是到了老龄幼虫时生长停止，说明 DNase 参与核酸代谢的水平降低。因此，对整个幼虫期来说，生长速率是不均衡的，DNase 的活力亦就存在差异。

二、毒剂处理后马尾松毛虫幼虫体内几个生理生化指标的变化动态

1. 氰戊菊酯处理后蛋白质含量的变化

用大于 LD_{50} 剂量的氰戊菊酯处理正常的各龄幼虫后，表现的中毒症状为兴奋期和抑制期。在兴奋期，虫体受刺激立即击倒，短期极度兴奋，接着不停地颤抖、痉挛；抑制期处于麻痹状态，最后死亡。图1为3—6龄马尾松毛虫幼虫用高剂量氰戊菊酯处理后蛋白质含量的变化。当虫体接触毒剂后1分钟就引起兴奋，迅速爬行，相持1小时左右，此时测定蛋白质含量上升。接着虫体不停地颤抖或痉挛，约持续6小时，其蛋白质含量下降，有的略有波动上升，随后又下降，进入抑制期，从麻痹直至死亡可持续1—2天。其间蛋白质含量平稳下降，均低于正常水平，各龄幼虫蛋白质含量变化基本相似。正常虫体随着虫龄增大蛋白质含量上升，毒剂处理后蛋白质含量呈下降趋向，低于正常水平，说明中毒的虫体蛋白质的合成速率渐进阻遏，干扰蛋白质的正常代谢.

2. 氰戊菊酯处理后 DNase 活力的变化

Lehman (1967) 认为生物体内的 DNase 既可以参加 DNA 的合成，也参与降解作

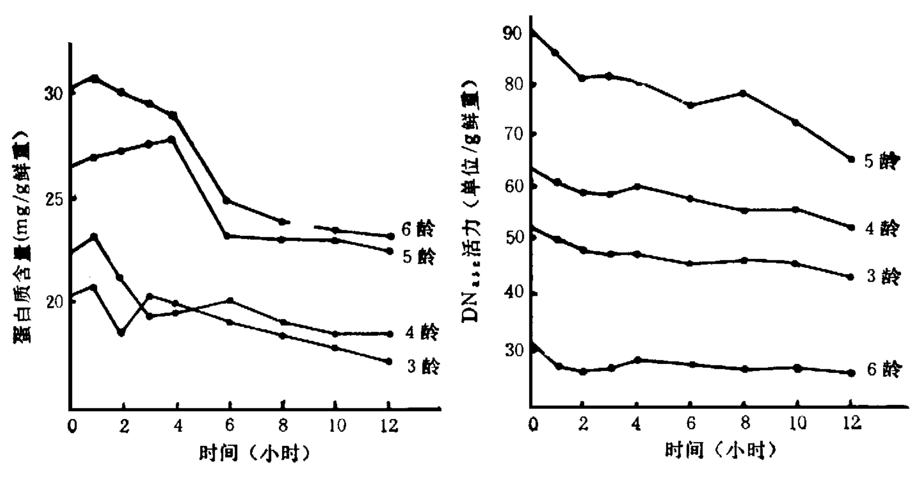


图 1　氰戊菊酯处理马尾松毛虫幼虫后蛋白质含量的变化

图 2　氰戊菊酯处理马尾松毛虫幼虫后 DNase 活力的变化

用，从本文结果也证明这一点。正常幼虫的生长速度与 DNA 合成成正相关，当毒剂处理马尾松毛虫幼虫后，体内的 DNase 活力便开始下降，低于正常虫体的 DNase 活力水平(见图 2)，说明中毒虫体中的 DNA 合成功能下降，丧失复制和转录功能，导致蛋白质合成受阻，使虫体渐进麻痹，直至死亡。

3. 氰戊菊酯处理后 RNase 活力的变化

从图 3 可以明显地看出，3 龄幼虫接触毒剂后，在 1 小时内 RNase 活力迅速上升达到高峰值；4 龄幼虫在 2 小时内 RNase 活力达到高限；5 龄和 6 龄幼虫在 3 小时内 RNase 活力达到高限，随后逐渐下降。这一结果说明，中毒虫体的 RNase 活力出现峰值时间随着虫龄增大而推延。但中毒虫体最终的 RNase 活力均高于正常虫体的 RNase 活力水平(见表 3)。可能因中毒虫体的膜结构被破坏，损害正常代谢而促使 RNase 活力上升。

表 3　氰戊菊酯对马尾松毛虫幼虫 RNase 活力的影响　　(单位/克鲜重)

虫龄	正常虫体 RNase 活力	中毒虫体 RNase 活力(小时)				中毒虫体RNase相对活力(%)*(小时)			
		1	2	3	12	1	2	3	12
3	85	105	90	86	88	124	106	101	104
4	75	82	85	83	83	109	113	111	111
5	68	74	78	80	80	109	115	118	118
6	44	52	56	58	50	118	127	132	114

* 正常虫体相对活力为 100(%)。

4. 氰戊菊酯处理后羧酸酯酶活力的变化

羧酸酯酶是昆虫的一种解毒水解酶，可以将毒剂催化代谢。从表 1 可知，随着虫龄增大其酶的活力提高，表现出耐药力增强。当高剂量毒剂处理后(见图 4)，在不同中毒时间内呈现一定的规律，中毒后 1 小时，酶活力出现上升，在 2 小时出现高峰值，随后逐渐下降，12 小时均低于正常虫体酶的活力，可能与羧酸酯酶本身的蛋白质合成代谢受阻有

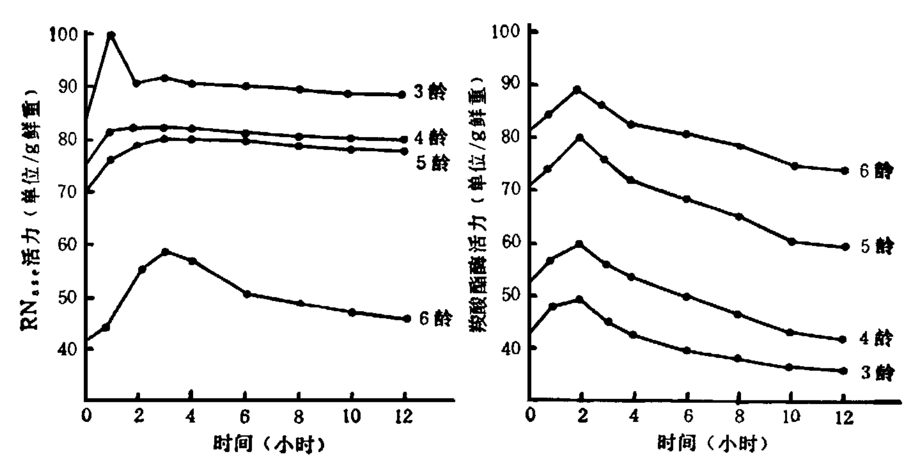


图 3 氰戊菊酯处理马尾松毛虫幼虫后 RNase 活力的变化

图 4 氰戊菊酯处理马尾松毛虫幼虫后羧酸酯酶活力的变化

关。

5. 氰戊菊酯处理后多酚氧化酶活力的变化

多酚氧化酶在昆虫中对酪氨酸的代谢有关，而酪氨酸在脱皮时的鞣化过程中起着重要作用 (Rockstein, 1972)。从表 1 看，随着虫龄增大，多酚氧化酶活力渐进提高，6 龄时活力最高，它是 3 龄的 2.7 倍，虫龄与酶活力的关系极密切 ($P < 0.01$，见表 2)。但毒剂处理后(见图 5)，多酚氧化酶活力变化比较平稳，与正常虫体的活力差异不大，这种酶的活力与虫体的耐药性之间没有明显的相关性。

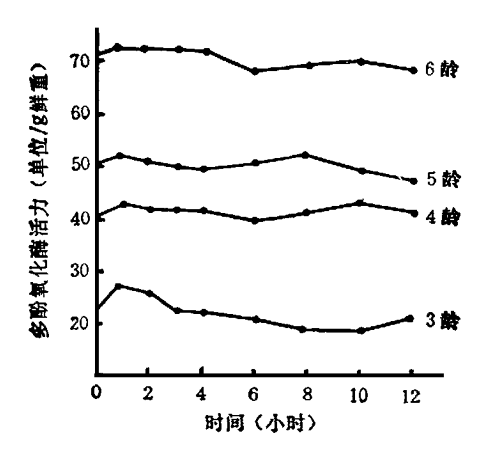


图 5 氰戊菊酯处理马尾松毛虫幼虫后多酚氧化酶活力的变化

参 考 文 献

文定元等 1986 四种松毛虫酯酶同工酯初步研究。湖南林业科技 4: 23。

朱鹏飞等 1990 马尾松毛虫血糖和血脂的变化动态及杀虫剂的影响效应。林业科学研究 3(1): 16—21。

何沛等 1966 低浓度 DDT 对越冬松毛虫幼虫的毒效及若干生理指标变动的分析。昆虫学报 15(2): 148—51。

Bradford, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *An. Biochem.* 72: 248—54.

Eley, J., J. S. Roth 1966 Partial purification and properties of nuclease from chicken pancreas. *J. Biol., Chem.*

241: 3063.

Hanson, D. N. & J. L. Fairley 1969 Enzymes of nucleic acid metabolism from wheat seedlings. I. Purification and general properties of associated deoxyribonuclease, ribonucleasa, and 3'-nucleotidase. *J. Biol. Chem.* 244: 2440—9.

Lehman, I. R. 1967 Deoxyribonuclease: Their relationship to deoxyribonucleic acid synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 36: 645—68.

Rockstein, M. 1972 In "Molecular Genetic Mechanisma in Development and Aging" (M. Rockstein and G. T. Baker, eds.), p. 1—10. Academic Press, New York.

CORRELATION OF PROTEIN, NUCLEASE AND CARBOXYLESTERASE WITH PESTICIDE RESISTANCE IN MASSONPINE CATERPILLAR

Li Zhou-zhi

(*Nanjing Forestrial University, Nanjing* 210037)

The content of protein and activities of carboxylesterase (CarE) and polyphenol oxidase in larval stage of the massonpine caterpillar *Dendrolimus pinctatus* Walker showed positive correlation with age increase in instars. After treatment with fenvalerate, the content of protein and activity of CarE increased during exciting stage but reduced to normal level during inhibitory stage. The activity of polyphenol oxidase showed less change. The activity of DNase increased with age from third to fifth instar, but decreased in the sixth instar. The activity of RNase showed negative correlation with the increase of larval instars. After applying fenvalerate, the activity of DNase began to drop and that of RNase rose during exciting stage, but dropped to normal level during inhibitory stage. The results showed correlations among protein, nuclease and CarE with insecticide tolerance, except polyphenol oxidase. Based on the results of toxicity test, it is clear that the insecticide tolerance of massonpine caterpillat increased with larval instars. The lethal dosage of fenvalerate to larvae in fifth instar is 2.8 times that to larvae in third instar and that to larvae in sixth instar is 2.3 times that to larvae in fourth instar. It will be rational to carry out chemical control before larvae in fourth instar.

Key words *Dendrolimus punctatus*——pesticide tolerance——protein——nuclease——carboxylesterase——polyphenol oxidase